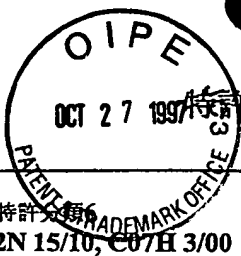


PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

OCT 27 1997

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 15/10, C07H 3/00	A1	(11) 国際公開番号 WO97/07207  (43) 国際公開日 1997年2月27日 (27.02.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02263  (22) 国際出願日 1996年8月9日 (09.08.96)  (30) 優先権データ 特願平7/211862 1995年8月21日 (21.08.95) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三光純薬株式会社(SANKO JUNYAKU CO., LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区岩本町1丁目10番6号 TMMビル Tokyo, (JP) (72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてののみ) 薄井 貢(USUI, Mitsugu)(JP/JP) 〒270-11 千葉県我孫子市寿2丁目9番20号 ライオンズマンション我孫子寿206号 Chiba, (JP) 山口真理(YAMAGUCHI, Mari)(JP/JP) 〒241 神奈川県横浜市旭区中希望ヶ丘8番地37 Kanagawa, (JP) 金島才仁(KANESHIMA, Motohito)(JP/JP) 〒302 茨城県取手市取手2丁目18番30号 ルックハイツ取手第2-307 Ibaraki, (JP)	(74) 代理人 弁理士 石原昭二(ISHIHARA, Shoji) 〒170 東京都豊島区東池袋3丁目7番8号 若井ビル302号 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書	
<p>(54)Title: COPRECIPITANT AND METHOD OF EXTRACTING NUCLEIC ACIDS</p> <p>(54)発明の名称 共沈剤及び核酸の抽出方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A coprecipitant to be used in the recovery of minute amounts of nucleic acids by the alcoholic precipitation thereof with isopropyl alcohol, ethanol or the like, which is compatible with nucleic acids, neither competes with reverse transcription nor inhibits polymerase chain reaction, can yield visible white or blue precipitates in order to minimize technical errors, and improves the recovery rate of nucleic acids; and a method of extracting nucleic acids by using the coprecipitant. The coprecipitant is characterized by exhibiting the same behavior as that of nucleic acids in the process of extracting the acids from biological materials and/or specimens by centrifugal separation and being capable of precipitating as visible white or blue precipitates in the process of alcoholic separation and concentration.</p>		

(57) 要約

イソプロピルアルコールやエタノール等によるアルコール沈殿による微量な核酸の回収において、核酸と親和性を有し、逆転写反応と競合せず、PCR反応を阻害しないで、テクニカルエラーを最小限に抑えるべく、白い沈殿物または青い沈殿物として目視を可能にすると同時に核酸の回収率を向上させる共沈剤及びその共沈剤を用いた核酸の抽出方法を提供する。

生物材料及び／又は被験試料から遠心分離操作によって核酸を抽出する過程において、核酸と同じ挙動を示し、アルコールによる分離濃縮処理時に白色又は有色の目視可能な沈殿物として沈殿する性質を有することを特徴とする共沈剤。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド		ヴァイ共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム

## 明細書

### 共沈剤及び核酸の抽出方法

#### 技術分野

本発明は、血液、尿、髄液、痰、精液、細胞、組織、生検標本等の生物材料及び／又は被験試料からの核酸抽出の過程におけるアルコール処理による核酸の回収操作において、核酸と同じ挙動を示し、遠心分離操作により目視可能な沈殿物として沈殿し、高い回収率で再現性よく核酸を回収するために使用する共沈剤及びその共沈剤を用いた核酸の抽出方法に関する。

#### 背景技術

最近核酸プローブを用いた研究や診断が急速に進歩し、検体処理の簡略化及び核酸以外の不純物を取り除き高純度に核酸を精製することが重要となっている。

たとえば、核酸ハイブリダイゼーションを行う場合、DNA 試料の精製が不十分だとDNA に蛋白が結合したり、また炭水化物を含んでいると制限酵素によるDNA の消化を阻害するため、制限酵素の塩基配列を認識することができず、満足の行く成績を得ることができない。また、RNA 試料を用いた核酸ハイブリダイゼーションを行う場合も、RNA 試料の精製が不十分であると核酸ハイブリダイゼーションで満足の行く成績を得ることができない。核酸ハイブリダイゼーションを行う場合または制限酵素によるDNA の消化を行う場合には、あらかじめDNA を十分に精製することが大切である。

非放射性標識法によるプローブの検出の場合、不純物が混入した試料を用いると試薬に用いた抗体やアビジンが非特異的に不純物に結合し、判定を誤ってしまうことがある。

精製DNA またはRNA を調製するには通常基本的に4つの操作を行う必要がある。すなわち、①細胞の溶解、②除蛋白と脱炭水化物、③分離濃縮、④洗浄精製の4つの操作である。①細胞の溶解にはリゾチーム、アクロモペプチダーゼなどの細胞壁溶解酵素やプロテインナーゼK等の蛋白分解酵素を用いたり、アルカリやSDS等の界面活性剤を用いて細胞を破壊する。

また結核菌やぶどう球菌等強固な細胞壁を持つ微生物の場合、ビーズや超音波を用いて物理的に破壊させたりする。場合によってはこれに併用して細胞壁溶解酵素や蛋白分解酵素を作用させたり、アルカリや界面活性剤添加を組合わせて行う。

②の除蛋白と脱炭水化物については従来よりフェノール・クロロホルム法による抽出が最も多く使用されている。しかしこのフェノール・クロロホルム法は毒性が強いという時間と手間がかかるため大変扱いにくいという問題があった。

即ち、このフェノール・クロロホルム法においては、DNA は水性液体層（上層）に、変性蛋白質は水性液体層と有機液体層（下層）との中間層に綿状の白い層をつくるので、その白い層を吸い込まないようにDNA 層を注意深く口の広いピペットを用いて静かに吸い取り、新しいマイクロチューブに移すというような面倒な作業を必要とする。この操作には、時間がかかりかつ熟練を必要とするからDNA 回収の再現性に悪影響を及ぼし、しかも大量処理が困難であった。

②の後に③分離濃縮操作においては、核酸を含む水性液体から100%のイソプロピルアルコール又は100%のエタノール等で核酸（DNA またはRNA）を沈殿させて分離濃縮するが、従来の分離濃縮操作では、核酸を含む水性液体の塩濃度が高いため、この段階でイソプロピルアルコール（終濃度が50%）又はエタノール（終濃度が70%）等を加えても、核酸の沈殿物が無色透明であるため確認できず、この段階で核酸沈殿物を捨ててしまうことがあり、十分に核酸を回収することができなかった。核酸の抽出効率と抽出の正確度は、第一に、この分離濃縮操作時の核酸と共沈剤をいかにもれなく回収するかに依存する。

④洗浄精製においては、通常70%エタノールを用いて、分離濃縮された核酸から不純物を取り除き精製する。

これまでに抽出法を簡便に効率よく行うためにフェノール・クロロホルム法の改良が試みられているが、フェノールの危険性を避けるためにフェノール・クロロホルムを用いない方法も開発されている。

たとえば、リンパ球に感染するHIV-1、EBウイルスを検査するために、血液サンプルからDNA を抽出する場合、ヘパリン採血した血液をトリトンX-100で処理、遠心後沈殿物にグアニジンイソチオシアネートを加えた後イソプロ

パノールを加えDNAを析出、エタノール洗浄を行う方法があり、この方法では2時間以内にDNAを抽出することができる。

この方法はたいへん簡単ではあるが、対象試料が血液に限られ必ずしも一般的ではない。

さらに、迅速に核酸を抽出分離するための核酸抽出カラムを用いた方法もあるが、高価であるため処理コストがかかるという問題があり、一般には使いにくいという問題がある。

最近安価にかつ迅速に核酸を抽出する方法としてCTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）等の陽イオン界面活性剤のDNA結合性を利用した方法が報告されている（特開平2-31696号公報）。

この方法は細胞破壊の前処理後、CTABを加え有機溶剤中で核酸とCTABの複合体を形成させた後、高塩濃度の水溶液に溶解してDNAとCTABを解離し、エタノールまたはイソプロパノールでDNAを回収する方法である。この方法は危険性の高いフェノールは使わないものの実際には遠心、洗浄も多く操作も面倒である。

上記の問題点を解決し、核酸を簡便、迅速かつ高純度に抽出・精製する傾斜（デカンテーション）又は転倒分取可能な方法として、生物材料から核酸を溶出するための前処理を行ったのち、この前処理した生物材料にチキソトロピック増粘剤を含む非親水性の高比重有機液体と水性液体を加えて混合し、遠心分離後、上層と下層の境界面に非流動性の凝集層を形成し、上層の核酸を分離抽出するようにした核酸の抽出方法、いわゆる凝集分配法は既に提案されている（特開平4-220738号公報）。

一方、近年、ポリメラーゼチェインリアクション（Polymerase chain reaction以下、PCRと略称する）とリバーストランスクリプションポリメラーゼチェインリアクション（Reverse transcription Polymerase chain reaction以下、RT-PCRと略称する）の開発により極めて微量の核酸を短時間に増幅し検出することが可能となった。このPCRやRT-PCRによる核酸の検出では、まず目的の遺伝子を増幅し、その増幅DNAをアガロースゲル電気泳動法やハイブリダイゼーション法などを用いて検出するが、確実に検出できるか否かは被験試料からの核酸の抽出とそれに続くcDNA合成とPCRに用いられるプライマーに大きく依存している。

ことに微量な核酸の抽出においては、保存状況による被験試料成分の質的变化や病気の進展にともなう核酸の量的変化に影響されことなく、高純度でしかも高回収率に抽出できる方法でなければならない。

現在、核酸の抽出にはグアニジンチオシアネートとフェノール及びクロロホルムを組み合わせた方法（AGPC法と呼ばれる）が広く用いられているが、微量な核酸の抽出において特に留意すべき点は、タンパク質を除いた後のイソプロピルアルコールやエタノール等によるアルコール沈殿操作における確実な核酸の回収である。

一般的に被験試料中の核酸が微量な時は、アルコールによる沈殿操作時に各種生物由来のリボソームRNA やトランスファーRNA を共沈剤として添加するが、目的の核酸がRNA の場合は、抽出したRNA を逆転写反応によりDNA に変換してからPCR による増幅反応を行うために、共沈剤が逆転写反応を阻害してしまう問題点がある。また、グリコーゲン等を共沈剤として添加した場合、抽出した核酸との親和性が低くまた沈殿物は目視不能又は確認が困難なために微量な核酸の抽出には問題がある。

本発明は、上記の従来技術の問題点に鑑みて発明されたもので、イソプロピルアルコールやエタノール等のアルコール沈殿による核酸を含む水性液体からの核酸の分離濃縮操作の過程において、核酸と親和性を有し、逆転写反応と競合せず、PCR 反応を阻害しないで、テクニカルエラーを最小限に抑えるべく、白い沈殿物または青い沈殿物として目視を可能にすると同時に核酸の回収率を確実にする共沈剤及びその共沈剤を用いた核酸の抽出方法を提供するものである。

#### 発明の開示

上記課題を解決するために、本発明の共沈剤は、生物材料及び／又は被験試料から遠心分離操作によって核酸を抽出する過程において、核酸と同じ挙動を示し、各種アルコールによる分離濃縮処理時に白色又は青色の目視可能な沈殿物として沈殿する性質を有する。上記アルコールとしてはイソプロピルアルコール又はエタノールなどが用いられる。マイクロチューブ等の遠心分離管を用いる遠心分離操作においては、上記沈殿物は遠心分離管の底に付着する。

本発明の共沈剤として使用する物質は、デンプンやデンプンの構成成分であるアミロース、アミロペクチン、またはこれらの誘導体を使用し、アルコール沈殿における微量な核酸を白い沈殿物または青い沈殿物として目視を可能にするようにしたものである。即ち、本発明の共沈剤として用いられる物質は、長鎖グルコース結合多糖類、色素修飾長鎖グルコース結合多糖類又はこれらの誘導体が好適である。

本発明で用いられる共沈剤の長鎖グルコース結合多糖類の具体例としては、デンプンやデンプンの誘導体である、ソリュブルスターチ (Soluble Starch)、コーンスターチ (Corn Starch)、ポテトスターチ (Potato Starch)、ポテトソリュブルスターチ (Potato soluble Starch)、ホイールスターチ (Wheat Starch)、スターチアズール (Starch Azure) 等を挙げることができる。

または、デンプンの構成成分やその誘導体である、コーンアミロペクチン (Corn Amylopectin)、ポテトアミロペクチン (Potato Amylopectin)、アミロペクチンアンスラニレート (Amylopectin Anthranilate)、アミロペクチンアズール (Amylopectin Azure)、インソリュブルコーンアミロペクチン (Insoluble Cone Amylopectin)、ソリュブルポテトアミロペクチン (Soluble Potato Amylopectin)、コーンアミロース (Cone Amylose)、ポテトアミロース (Potato Amylose)、アミロースアズール (Amylose Azure) などを用いることが好ましい。

色素修飾長鎖グルコース結合多糖類の修飾される色素として好適な色素にアズールがあげられる。アズール (Azure) としては、レマゾールブリリアントブルーアール (Remazol Brilliant Blue R)、レマゾールブリリアントブルーアールーディーキシラン (Remazol Brilliant Blue R -D- Xylan)、レマゾールブリリアントバイオレット 5 アール (Remazol Brilliant Violet 5R) などを用いることができる。

共沈剤を溶解する適当な水溶液には、蒸留水、または、T. E 緩衝液 (一般的には 50 mM のトリスヒドロキシメチルアミノエタン-塩酸緩衝液 pH 8.0・20 mM の EDTA) 等の緩衝液や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、酢酸ナトリウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機塩およびその混合物があり、通常、約 0.1 M ~ 10.0 M の範囲の濃度

で使用する。本発明で用いられる共沈剤の濃度は0.5 ~100  $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは5 ~50  $\mu\text{g/ml}$ である。

本発明の核酸の抽出方法の第1の態様は、生物材料及び／又は被験試料から核酸を溶出するための前処理を行ったのち、この前処理した生物材料及び／又は被験試料の蛋白質の除去処理を行い、核酸を含む水性液体を分離し、分離した当該核酸を含む水性液体にイソプロピルアルコール又はエタノール等のアルコールを加えて混和し遠心分離して核酸を分離濃縮せしめるにあたり、核酸とともに沈殿する共沈剤として上記共沈剤を用いるものである。

上記方法における除蛋白処理としては、フェノールによる相分離抽出、カオトロピック剤による蛋白質の可溶化、陽イオン界面活性剤による核酸複合体の形成、ガラスフィルターによる核酸の捕捉又は磁気ビーズによる核酸の捕捉を用いることができる。

また、本発明の核酸の抽出方法の第2の態様は、生物材料及び／又は被験試料から核酸を溶出するための前処理を行ったのち、この前処理した生物材料及び／又は被験試料にチキソトロピック増粘剤を含む非親水性の高比重有機液体と水性液体を加えて混合し、遠心分離後、上層と下層の境界面に非流動性凝集層を形成させることにより核酸を含有する上層を容易に分離し、分離した当該核酸を含む水性液体にイソプロピルアルコール又はエタノール等のアルコールを加え、混和し遠心分離して核酸を分離濃縮せしめるにあたり、核酸とともに沈殿する共沈剤として上記共沈剤を用いるものである。この核酸の抽出方法は、一般に凝集分配法と呼ばれる。

本発明でいう生物材料及び／又は被験試料とは、血液、尿、髄液、痰、精液、細胞、組織、生検標本、酵母、真菌、細菌、ウイルス、培養細胞等を指称するものである。

本発明方法において上層と下層の境界面で凝集層を形成させるチキソトロピック増粘剤としては、蛋白質等の汚染物質と結合性がありかつ高比重有機液体に分散性のある増粘剤が用いられる。

本発明で用いられるチキソトロピック増粘剤としては、ベントナイト有機誘導体を用いるのが好ましい。



ベントナイト有機誘導体には、スメクタイト粘土の有機誘導体、ヘクトライト粘土の有機誘導体、モンモリナイト粘土の有機変性体、精製したスメクタイト粘土、特殊処理スメクタイト粘土、精製有機鉱物粘土等を用いることができる。

本発明のチキソトロピック増粘剤として用いられるスメクタイト粘土の有機誘導体としては、BENTONE 27（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE 34（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE 38（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE SD-1（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE SD-2（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE SD-3（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）等を好適に挙げるることができる。

また、本発明のチキソトロピック増粘剤として用いられるモンモリナイト粘土の有機変性体としてはBENTONE 128（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE 500（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、精製したスメクタイト粘土としてはMACALOID、特殊処理スメクタイト粘土としては、BENTONE EW（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、精製有機鉱物粘土としてはBENTONE LT（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）等を好適に挙げるることができる。

また、本発明のチキソトロピック増粘剤として用いられるスメクタイトの有機誘導体としては、BENTONE 34（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE SD-3（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE LT（エヌ・エル・インダストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロープ及びゲル化剤の商品名）、BENTONE EW（エヌ・エル・インダ

ストリイズ・インコーポレーテッド製、チクソトロップ及びゲル化剤の商品名)、MACALOID等を好適に挙げる事ができる。

しかし、本発明で用いられるチキソトロピック増粘剤は、本発明における非流動性の凝集層を形成するものであれば使用可能であり、上記した増粘剤に限定されるものでない。

本発明でいう高比重有機液体とは、水に難溶性又は不溶性の密度( $\text{gcm}^{-3}$ )として1.05以上の有機液体が適当である。

高比重有機液体として好適に用いられるものには、四塩化炭素、二硫化炭素等の無機化合物、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、1,2-ジブロモエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、クロロベンゼン、ブロモベンゼン、 $\alpha$ -ジクロロベンゼン等のハロゲン化合物、2,2,2-トリフルオロエタノール、フェノール等のアルコール、フルフラール等のアルデヒド、炭酸プロピレン、リン酸トリエチル等の酸誘導体、ニトロメタン、ニトロベンゼン等のニトロ化合物、スルホラン等の硫黄化合物がある。

また、上記の高比重有機液体の安定剤として添加する適当なアルコールとしては、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、イソアミルアルコール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、シクロヘキサノール、エチレングリコール、2-メトキシエタノール、2-エトキシエタノール等を使用する。

核酸を上層に溶出するための水性液体としては、水または塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、酢酸ナトリウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機塩および塩酸ジメチルアミン、塩酸トリメチルアミン等の有機塩を水溶液として用い、通常、約0.1M~10.0Mの範囲の濃度で使用するのが好ましい。この時核酸の回収率を高くするために、この水溶液に0.01~10%の適当な陰イオン界面活性剤または非イオン性界面活性剤を加えてもよい。高比重有機液体層と水性液体層との比は約1:5から5:1であり、これらの層は混和されたのち遠心分離によって形成された境界面の凝集層によって、下層の高比重有機液体層と上層の水性液体層とに分配させられ、傾斜(デカンテーション)で水性溶媒層(上層)が取り出される。

本発明の共沈剤は、核酸の抽出操作におけるどの段階でも単独あるいは他の共沈剤といっしょに添加することができる。例えば、①核酸抽出前の生物材料中に直接添加するか、又は、生物材料を破壊（細胞の溶解）して核酸を溶出するときに添加する、②タンパク質の除去操作のときに添加する、③核酸の分離濃縮操作のときに添加する、④核酸の洗浄精製操作のときに添加するのいずれの段階においても添加可能である。

上記した生物材料の破壊は、生物材料をキレート剤を含む緩衝液（pH5 ～9）中で前処理したのち、細胞膜または細胞壁等を破壊するために通常は約0.1%～10.0%（W/V）の範囲の濃度の陰イオン界面活性剤や非イオン性界面活性剤等の膜溶解剤と約1M～5Mのグアニジンチオシネートまたは約1M～5Mの塩酸グアニジン等のタンパク変性剤で処理することをいう。場合によっては細胞膜や細胞壁等を破壊するための酵素によって処理してもよい。

上記した細胞膜や細胞壁等を破壊するための酵素として好適に用いられるものは、約1 mg/ml から50mg/ml の濃度のリゾチーム、アクロモベプチダーゼ、リゾスタフィン、リチカーゼ、ムタノリシン等の膜溶解剤によって、もしくは約10  $\mu$ g/ml から20mg/ml の濃度のタンパク変性剤、たとえばプロテアーゼK、プロナーゼ、ペプシン、パパイン等がある。

上記したような前処理を行うと、生物材料は上記したキレート剤、膜溶解剤、タンパク変性剤等を含む水溶液に溶解し、この水溶液中には核酸と各種の生物物質が可溶化する。

次に、蛋白質の除去操作は、大きく分けてフェノールやチキソトロピック増粘剤を用いる相分配法と蛋白質を可溶化する方法の2つがある。

前者のフェノールでは、水飽和フェノールまたは緩衝液飽和フェノールを用いて、フェノールの蛋白質変性作用と水溶液と2層に分離する性質を利用して蛋白質を除去する。

一方、チキソトロピック増粘剤によるタンパク質の除去操作は、チキソトロピック増粘剤を含む高比重有機液体、または高比重有機液体の混合物、もしくはこれらの高比重有機液体とアルコールの混合物と核酸を上層に抽出するための水性液体を可溶化した生物材料中に加えて混合したのち遠心分離する。この時、蛋白

質等の汚染物質と結合したチキソトロピック増粘剤は、遠心分離による遠心力と高比重有機液体の浮力により中間層（境界面）に集められる。

その結果、チキソトロピック増粘剤の濃度が高くなり増粘効果に伴った粘性の変化によって非流動凝集層が形成され、傾斜（デカンテーション）により蛋白質を除去する。後者では、1価の陰イオンでイオン半径の大きなヨウ素イオン( $I^-$ )やトリフルオロ酢酸イオン( $CF_3COO^-$ )等のカオトロピックイオンを用いて、蛋白質などの疎水性分子の水溶性を増加させてその疎水結合を弱めることにより蛋白質を除去する。

上記した③のアルコールによる核酸の分離濃縮操作は、例えば、核酸を含む水溶液に等量の100%イソプロパノール（終濃度が50%）、又は2倍量の100%エタノール（終濃度が70%）を加えて核酸を分離濃縮させればよい。

上記した④のアルコールによる核酸の洗浄精製操作は、70%エタノールを加えて核酸を洗浄精製させればよい。

本発明は、C型肝炎、肝臓ガン等の発症原因とされるウイルスの核酸であるHCV-RNAの抽出において、特に有用である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明方法による転倒分取における核酸を含む水性液体層の分離の手順を示すもので、マイクロチューブにおける上層と下層の分離状態を示す図面である。

図2は、本発明方法による転倒分取によつての核酸を含む水性液体層の分離の手順を示すもので、マイクロチューブにおける上層と下層の界面に非流動性の凝集層が形成された状態を示す図面である。

図3は、本発明方法による転倒分取によつての核酸を含む水性液体層の分離の手順を示すもので、転倒分取操作によつて上層を新しいマイクロチューブに移す状態を示す図面である。

図4は、本発明方法による核酸を含む水性液体の分離濃縮の手順を示すもので、核酸を含む水性液体にアルコールを添加した状態を示す図面である。

図5は、本発明方法による核酸を含む水性液体の分離濃縮の手順を示すもので

、共沈剤と核酸との沈殿物の生成状態を示す図面である。

図6は、本発明方法による核酸を含む水性液体の分離濃縮の手順を示すもので、図5の状態から混和液体を廃棄した状態を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を挙げて説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されるものでないことは勿論である。

〔実施例1〕

C型肝炎ウイルスの5'-非翻訳(noncoding)領域をクローニングして合成したHCV-RNAを $10^1$ コピー〜 $10^4$ コピー/ $100\mu\text{l}$ となるように調製したものを $100\mu\text{l}$ と共沈剤として $10\mu\text{g}$ のアミロベクチンアズール(Amylopectin Azure)〔シグマ社製品番号A4640 (SIGMA Product Number A4640)〕を $1.5\text{ml}$ の滅菌済マイクロチューブに加え、セバジーンーRV〔三光純薬(株)製核酸抽出試薬〕の試薬I(共沈剤としてグリコーゲンを含む)を $300\mu\text{l}$ 加えて均一に混合した後、 $300\mu\text{l}$ のセバジーンーRV〔三光純薬(株)製核酸抽出試薬〕の試薬IIと $600\mu\text{l}$ のセバジーンーRV〔三光純薬(株)製核酸抽出試薬〕の試薬IIIを添加して上下に10分間激しく振盪混和する。 $0^\circ\text{C}$ (氷水中)で15分間放置した後、 $12,000\text{rpm}$ で15分間( $4^\circ\text{C}$ )遠心分離を行ない、HCV-RNAを含む上層(水層)をデカンテーションにより別のマイクロチューブに移す。上層(水層)と等量の $100\%$ イソプロピルアルコールを加え転倒混和後、 $-20^\circ\text{C}$ で45分間放置したHCV-RNAを析出させ、 $12,000\text{rpm}$ で15分間( $4^\circ\text{C}$ )の遠心分離を行い、上清を除去し、マイクロチューブの底に付着しているペレット(HCV-RNAは青い共沈物として目視で確認できる)に $70\%$ エタノールを加え混和する。さらに $12,000\text{rpm}$ で10分間( $4^\circ\text{C}$ )遠心分離した後、上清を除去する(HCV-RNAは青い共沈物として目視で確認できる)。次に約5分間減圧乾燥して滅菌再蒸留水に溶解し、この溶解液についてcDNA合成反応を行った後、2段階(Two step)PCR法を行った。増幅されたPCR産物は $2\%$ アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色し、バンドの有無により抽出効率を確認し、その結果を表2に示した。

上記のcDNA合成反応は、HCV-RNA抽出画分に予め調整したマスターミックス(

Master Mix.) (滅菌蒸留水3.75  $\mu$ l, 5  $\times$ ファーストストランドバッファー (first strand buffer) 2  $\mu$ l, 2.5mM ディエヌティピーミックスチャー (dNTPmixture) 2  $\mu$ l, 0.1M ディチオチオ (MDTT) 1  $\mu$ l, 10pmol アンチセンスプライマー (Antisens primer) 0.5  $\mu$ l) を加え、70℃で1 分間、55℃で1 分間反応させた後、急冷し、アールエヌエーエスイン (RNasin) (プロメガ (Promega) 社製) 0.5  $\mu$ l, エムエムエルヴィリバーストランスクリプターゼ (MMLVreverse transcriptase) (ビーアールエル(BRL) 社製) 0.25  $\mu$ l を加え、37℃で30分間および95℃で5 分間の逆転写反応を行った。

上記の2段階 (Two step) PCR法は、合成したcDNA全量(10  $\mu$ l)に、10 $\times$ 反応緩衝液 (reaction buffer) 2.5  $\mu$ l, 2.5mM ディエヌティピーミックスチャー (dNTPmixture) 2  $\mu$ l, 滅菌蒸留水10.2  $\mu$ l, 10pmol センスプライマー (sensprimer) 0.25  $\mu$ l, 5U/ $\mu$ l タクDNAポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) (宝酒造 (株) 製) 0.05  $\mu$ l を加え、94℃で1 分間、55℃で1 分間、72℃で1 分間、30サイクルでファースト (1st) PCR を行った。次に、10 $\times$ 反応緩衝液 (reaction buffer) 5  $\mu$ l, 2.5mM ディエヌティピーミックスチャー (dNTPmixture) 1  $\mu$ l, 滅菌蒸留水41.9  $\mu$ l, 内側の10pmol プライマー (Primer) (センスプライマー (sensprimer), アンチセンスプライマー (antisensprimer)) 各0.5  $\mu$ l, 5U/ $\mu$ l タクDNAポリメラーゼ (Taq DNA Polymerase) 0.1  $\mu$ l にファースト (1st) PCR 産物1  $\mu$ l を加え、94℃で1 分間、55℃で1 分間、72℃で1 分間、30サイクルでセカンド (2nd) PCR を行った。PCR に使用したプライマーは、HCV-RNA の5'- 非翻訳領域に設定したプライマーを使用した。

この時の実施例におけるHCV-RNA の抽出の操作性においては、イソプロピルアルコールによる沈殿操作からHCV-RNA を青い共沈物として目視で確認できた。また、表1に示すごとく、回収率においても、確実に10<sup>4</sup>コピーの合成HCV-RNAを抽出することができた。

#### (比較例1)

本発明の共沈剤 (アミロペクチンアズール) を添加しないこと以外は、実施例1と同様の実験を行い、その結果を表1に示した。本比較例では、イソプロピルアルコールによる核酸の分離濃縮操作において、核酸の目視はできなかった。

表 1

## 合成HCV-RNAの血清希釈による抽出限界試験

合成HCV-RNAのコピー数						
抽出法	例数	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	陰性対照
実施例1	1	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	-
比較例1	1	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	-

<sup>1)</sup> + : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認されたサンプル。

## 〔実施例2〕

上記した実施例1で使用した1.5mlのマイクロチューブを2.2mlのマイクロチューブに変えて、600 $\mu$ lの100%イソプロピルアルコールの代わりに、1200 $\mu$ lの100%のエタノールを加えて、実施例1と同様に同じ合成HCV-RNAを用いてHCV-RNAの抽出を行った。

この時の実施例におけるHCV-RNAの抽出の操作性においては、100%のエタノールによる沈殿操作からHCV-RNAを青い共沈物として目視で確認できた。また、回収率においても、確実に $10^1$ コピーの合成HCV-RNAを抽出することができた(表2)。

表 2

合成HCV-RNAの血清希釈による抽出限界試験

合成HCV-RNAのコピー数						
抽出法	例数	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	陰性対照
実施例 2	1	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	-

<sup>1)</sup> + : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認されたサンプル。

## 〔実施例 3〕

HCV 陰性の新鮮なヒト正常血清を用いて、C型肝炎患者血清を10<sup>1</sup> 倍～10<sup>7</sup> 倍まで希釈して調製した100  $\mu$ l の被験試料を1.5ml の滅菌済マイクロチューブに加え、セバジーン-RV〔三光純薬(株)製核酸抽出試薬〕の試薬I(共沈剤としてグリコーゲンを含む)を300  $\mu$ l 加えて均一に混和した後、300  $\mu$ l のセバジーン-RV〔三光純薬(株)製核酸抽出試薬〕の試薬IIと600  $\mu$ l のセバジーン-RV〔三光純薬(株)製核酸抽出試薬〕の試薬IIIを添加して上下に10分間激しく振盪混和する。0℃(氷水中)で15分間放置した後、12,000rpm で15分間(4℃)遠心分離を行ない、HCV-RNAを含む上層(水層)をデカンテーションにより別のマイクロチューブに移す。上層(水層)に共沈剤として30  $\mu$ g のアミロペクチンアズール(Amylopectin Azure)〔シグマ社製品番号A 4 6 4 0 (SIGMA Product Number A 4 6 4 0)〕と600  $\mu$ l のイソプロピルアルコールを加え転倒混和後、-20℃で45分間放置してHCV-RNAを析出させ、12,000rpm で15分間(4℃)の遠心分離を行い、上清を除去し、マイクロチューブの底に付着しているペレット(HCV-RNAは青い共沈物として目視で確認できる)に70%エタノールを加え混和する。さらに12,000rpm で10分間(4℃)遠心分離した後、上清を除去する(HCV-RNAは青い共沈物として目視で確認できる)。次に約5分間減圧乾燥して滅菌再蒸留水に溶解し、この溶解液について実施例1と同様にcDNA合成反応を行った後、2段階(Two step)PCR法を行った。増幅されたPCR産物は2%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色し、バンドの有無により



抽出効率を確認した。

この時の実施例におけるHCV-RNAの抽出の操作性においては、イソプロピルアルコールによる沈殿操作からHCV-RNAを青い共沈物として目視で確認できた。また、回収率においても、確実に $10^5$ 倍希釈の患者血清からHCV-RNAを抽出することができた(表3)。

表3

C型肝炎患者希釈血清による抽出限界試験

H C V 患 者 血 清 の 希 釈 倍 数									
抽出法	例数	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	陰性対照
実施例3	1	+	+	+	+	+	- <sup>2)</sup>	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-

<sup>1)</sup> + : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認されたサンプル。

<sup>2)</sup> - : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認できなかったサンプル。

#### 〔実施例4〕

上記した実施例1で使用した1.5mlのマイクロチューブを2.2mlのマイクロチューブに変えて、600 $\mu$ lの100%イソプロピルアルコールの代わりに、1200 $\mu$ lの100%エタノールを加えて、実施例1と同様に同じHCV患者血清を用いてHCV-RNAの抽出を行った。

この時の実施例におけるHCV-RNAの抽出の操作性においては、100%のエタノールによる沈殿操作からHCV-RNAを青い共沈物として目視で確認できた。また、回収率においても、確実に $10^5$ 倍希釈の患者血清からHCV-RNAを抽出することができた(表4)。

表 4

## C型肝炎患者希釈血清による抽出限界試験

H C V 患 者 血 清 の 希 釈 倍 数									
抽出法	例数	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	陰性対照
実施例 4	1	+	+	+	+	+	- <sup>2)</sup>	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-

<sup>1)</sup> + : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認されたサンプル。

<sup>2)</sup> - : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認できなかったサンプル。

## 〔実施例 5〕

従来公知のAGPC法に本発明の共沈剤を加えて実験を行った。HCV 陰性の新鮮なヒト正常血清を用いて、C型肝炎患者血清を10<sup>1</sup> 倍～10<sup>7</sup> 倍まで希釈して調製した100  $\mu$ l の被験試料を1.5ml の滅菌済マイクロチューブに加えた後、200  $\mu$ l の溶解液 (4Mグアニジンチオシアネート、2-メルカプトエタノール) と共沈剤として5  $\mu$ l の酵母由来tRNA (4 mg/ml)を加えて溶解する。次いで、200  $\mu$ l の水飽和フェノール、17  $\mu$ l の2M酢酸ナトリウム、40  $\mu$ l のクロロホルム・イソアミルアルコール (49:1) を加えよく混和し、4  $^{\circ}$ C、15分間放置した。放置後、12,000rpm で15分間 (4  $^{\circ}$ C) 遠心分離を行ない、HCV-RNA を含む上層 (水層) を別のマイクロチューブに移す。上層 (水層) に等量の100%イソプロピルアルコールを加え転倒混和後、-20  $^{\circ}$ Cで一晩放置してHCV-RNA を析出させ、12,000rpm で15分間 (4  $^{\circ}$ C) の遠心分離を行い、上清を除去し、マイクロチューブの底に付着しているペレットに共沈剤として30  $\mu$ g のアミロベクチンアズール (Amylopectin Azure) (シグマ社製品番号A 4 6 4 0 (SIGMA Product Number A 4 6 4 0)) と70% エタノールを加え混和する。さらに12,000rpm で10分間 (4  $^{\circ}$ C) 遠心分離した後、上清を除去する (HCV-RNA は青い共沈物として目視で確認できる)。次に約5 分間減圧乾燥 (室温) して滅菌再蒸留水に溶解し、この溶解液について実施例 1 と同様にcDNA合成反応と2段階 (Two step) PCR法を行い、増幅されたPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認した。

この時の実施例におけるHCV-RNA の抽出の操作性においては、イソプロピルアル

コールによる沈殿操作からHCV-RNAを青い共沈物として目視で確認できた。また、回収率においても、比較例2のAGPC法と比較して同等もしくは同等以上の成績であった(表5)。

〔比較例2〕

本発明の共沈剤(アミロペクチンアズール)を添加しないこと以外は、実施例5と同様の条件で実験を行い、その結果を表5に示した。本比較例における沈殿物は目視不能であった。

表5

C型肝炎患者希釈血清による抽出限界試験

H C V 患 者 血 清 の 希 釈 倍 数									
抽出法	例数	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	陰性対照
実施例5	1	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	-	- <sup>2)</sup>	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-
比較例2	1	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> + : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認されたサンプル。

<sup>2)</sup> - : アガロースゲル電気泳動でバンドが確認できなかったサンプル。

〔実施例6〕

アミロペクチンアズールの代わりにアミロペクチンを用いた以外は実施例5と同様の実験を行った。100%イソプロピルアルコールによる分離濃縮においてHCV-RNAを白い共沈物として確認できた。また、回収率においても実施例5と同様であった。

続いて、添付図面に基づいて本発明方法の操作を説明する。

図1は、生物材料の破壊と同時に蛋白質の汚染物質が変性して、核酸および核酸以外の不純物が分散している水溶液体11と、生物材料中の汚染物質等と結合性がありかつ相分配抽出において上層と下層の境界面で非流動性凝集層を形成して傾斜(デカンテーション)又は転倒による核酸の分離を可能ならしめるための

チキソトロピック増粘剤を含む高比重有機液体、または高比重有機液体の混合物、もしくはこれらの高比重有機液体とアルコールの混合物 1 2 とをマイクロチューブ T 1 に分離した状態を示した図面である。

図 2 は、DNA を含む水性液体の上層 1 3 と、遠心分離による遠心力と高比重有機液体の浮力により、蛋白質等と結合したチキソトロピック増粘剤が中間層（境界面）に集められ、チキソトロピック増粘剤の濃度が高くなり、その増粘効果に伴う粘性の変化により形成された非流動性凝集層 1 4 と、蛋白質等の汚染物質を含む高比重有機液体、または高比重有機液体の混合物、もしくはこれらの高比重有機液体とアルコールの混合物の下層 1 5 とに分離した状態を示す図面である。

図 3 はデカンテーションで新しいマイクロチューブ T 2 に DNA を含む水性液体の上層 1 3 を移した状態を示す図面である。

図 4 はマイクロチューブ T 2 に移した核酸(DNA) を含む水性液体 1 3 にアルコール 1 6 を加えた状態を示す図面である。図 4 において両者を混和して混和液体 1 8 とし、さらに遠心分離すると、図 5 に示すごとく、有色の沈殿物（共沈剤＋核酸） 1 7 がマイクロチューブ T 2 の底に付着する。図 6 は混和液体 1 8 を廃棄し、有色沈殿物 1 7 のみをマイクロチューブ T 2 内に残した状態を示す図面である。本発明の共沈剤は図 1 ～図 5 のどの段階で添加してもよい。

#### 産業上の利用可能性

被検試料中に微量にしか存在しない HCV-RNA を確実に回収するために、本発明においては、各抽出操作のどの段階でも共沈剤を添加することにより、イソプロピルアルコール沈殿時やエタノール沈殿時に、HCV-RNA の存在を青い沈殿物として確実に目視確認できるため、抽出操作時に発生するテクニカルエラーを最小限に抑える効果がある。

本発明はセバジーン R V（三光純薬（株）製核酸抽出試薬）での使用に限定したものでないことは勿論であるが、対照に用いた AGPC 法や他の抽出法においてもイソプロピルアルコール沈殿時やエタノール沈殿時に、HCV-RNA の存在を青い沈殿物として確実に目視確認使用することが可能である。

本発明による共沈剤は、各抽出段階のHCV-RNA の回収操作において、HCV-RNA と同じ挙動を示すために、HCV-RNA の回収率が向上する。

本発明による共沈剤は、逆転写反応やPCR 反応と競合しなく、及び／又はそれらの反応を阻害しないために、これらの反応による検出感度に影響を与えない。

本発明方法によれば、上層と下層の境界面に非流動凝集層が形成されるため境界面が明瞭になり、なお、かつ傾斜（デカンテーション）によって上層の拡散を含む水性液体層を容易に分離できる。

## 請求の範囲

1. 生物材料及び／又は被験試料から遠心分離操作によって核酸を抽出する過程において、核酸と同じ挙動を示し、アルコールによる分離濃縮処理時に白色又は有色の目視可能な沈殿物として沈殿する性質を有することを特徴とする共沈剤。
2. 長鎖グルコース結合多糖類、色素修飾長鎖グルコース結合多糖類又はこれらの誘導体の1種又は2種以上であることを特徴とする請求項1記載の共沈剤。
3. ソリユブルスターチ、コーンスターチ、ポテトスターチ、ポテトソリユブルスターチ、ホイールスターチ、スターチアズール、コーンアミロペクチン、ポテトアミロペクチン、アミロペクチンアンスラニレート、アミロペクチンアズール、インソリユブルコーンアミロペクチン、ソリユブルポテトアミロペクチン、コーンアミロース、ポテトアミロース、アミロースアズールの1種又は2種以上であることを特徴とする請求項1記載の共沈剤。
4. 上記アルコールがイソプロピルアルコール又はエタノールであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の共沈剤。
5. 生物材料及び／又は被験試料から核酸を溶出するための前処理を行ったのち、この前処理した生物材料及び／又は被験試料の蛋白質の除去処理を行い、核酸を含む水性液体を分離し、分離した当該核酸を含む水性液体にアルコールを加えて混和し遠心分離して核酸を分離濃縮せしめるにあたり、核酸と共に沈殿する共沈剤として請求項1～4のいずれか1項記載の共沈剤を用いることを特徴とする核酸の抽出方法。
6. 上記除蛋白処理が、フェノールによる相分離抽出、カオトロピック剤による蛋白質の可溶化、陽イオン界面活性剤による核酸複合体の形成、ガラスフィルターによる核酸の捕捉又は磁気ビーズによる核酸の捕捉であることを特徴とする請求項5記載の核酸の抽出方法。
7. 生物材料及び／又は被験試料から核酸を溶出するための前処理を行ったのち、この前処理した生物材料及び／又は被験試料にチキソトロピック増粘剤を含む非親水性の高比重有機液体と水性液体を加えて混合し、遠心分離後、上層と下層の境界面に非流動性凝集層を形成させることにより核酸を含有する上層を容易に分離し、分離した当該核酸を含む水性液体にアルコールを加えて混和し遠心分離

して核酸を分離濃縮せしめるにあたり、核酸と共に沈殿する共沈剤として請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の共沈剤を用いることを特徴とする核酸の抽出方法。

8. 上記アルコールがイソプロピルアルコール又はエタノールであることを特徴とする請求項 5～7 のいずれか 1 項記載の核酸の抽出方法。

9. 前記核酸が H C V - R N A であることを特徴とする請求項 5～8 のいずれか 1 項記載の核酸の抽出方法。

10. 前記共沈剤の濃度が 0.5 ～100  $\mu$ g/ml であることを特徴とする請求項 5～9 のいずれか 1 項記載の核酸の抽出方法。

図 1

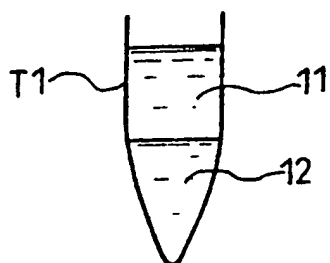


図 2

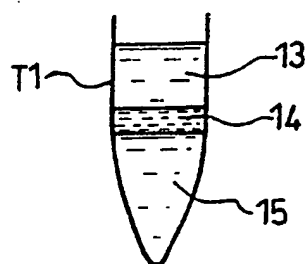


図 3

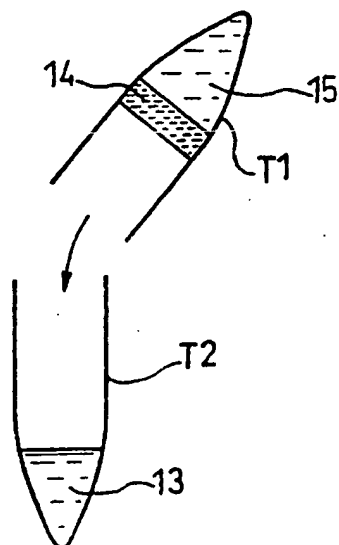




図 4

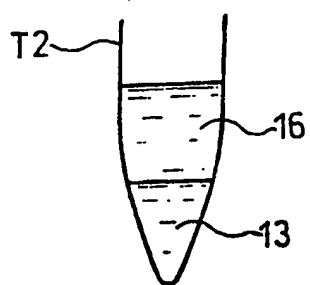


図 5

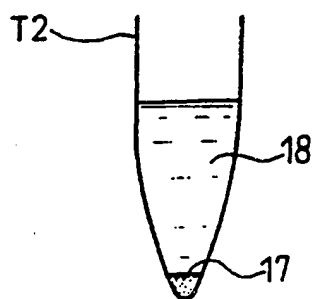
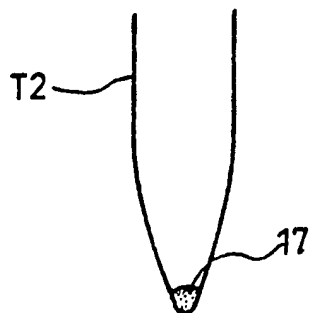


図 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02263

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/10, C07H3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/10, C07H3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 06-46856, A (Sanko Junyaku Co., Ltd.), February 22, 1994 (22. 02. 94) (Family: none)	1 - 10
A	JP, 02-31696, A (Microprove Corp.), February 1, 1990 (01. 02. 90) & EP, 338591, A	1 - 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 1, 1996 (01. 11. 96)

Date of mailing of the international search report

November 12, 1996 (12. 11. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/10, C07H3/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/10, C07H3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L, BIOSIS PRE VIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 06-46856, A (三光純薬株式会社) 22.2月.1994 (22.02.94), (ファミリーなし)	1-10
A	JP, 02-31696, A (マイクロプロブ・コーポレーション) 01.2月.1990 (01.02.90), & EP, 338591, A	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.11.96

国際調査報告の発送日

12.11.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

印

4B | 8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448